

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 9 月 18 日 (18.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/076638 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12P 17/02, C07D  
493/04, 303/32, A61P 17/06, 27/02, 29/00, 35/00, 43/00 //  
(C12P 17/02, C12R 1:66)

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02634

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 6 日 (06.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-63059 2002 年 3 月 8 日 (08.03.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): メルシヤ  
ン株式会社 (MERCIAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒  
104-8305 東京都中央区京橋 1 丁目 5 番 8 号 Tokyo  
(JP). 財団法人微生物化学研究会 (ZAIDAN HOJIN  
BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI) [JP/JP]; 〒  
141-0021 東京都品川区上大崎 3 丁目 1 4 番 2 3 号  
Tokyo (JP).

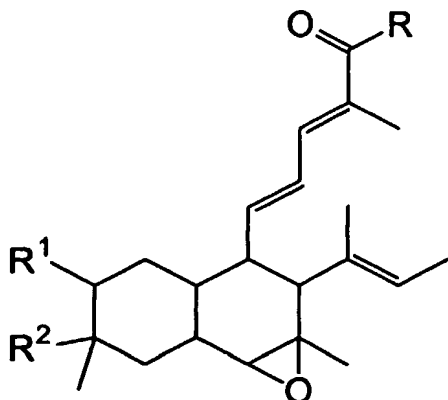
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 熊谷 博行  
(KUMAGAI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒253-0035 神奈川県茅ヶ崎市 浜須賀 1 1-5 Kanagawa (JP). 鮫島 朋宏  
(SAMESHIMA, Tomohiro) [JP/JP]; 〒251-0052 神奈川  
県 藤沢市 藤沢 1-3-7-5 0 1 Kanagawa (JP). 松  
藤 素子 (MATSUFUJI, Motoko) [JP/JP]; 〒201-0005 東  
京都 狛江市 岩戸南 3-2 3-5 Tokyo (JP). 河村 直  
人 (KAWAMURA, Naoto) [JP/JP]; 〒242-0007 神奈川  
県 大和市 中央林間 6-2-1-2 0 7 Kanagawa (JP).  
柴野 哲也 (SOMENO, Tetsuya) [JP/JP]; 〒330-0825 埼  
玉県 さいたま市 東新井 7 1 0-5 0 1 6-2 0 1  
Saitama (JP). 石塚 雅章 (ISHIZUKA, Masaaki) [JP/JP];  
〒145-0072 東京都 大田区 田園調布本町 3-1 7  
Tokyo (JP). 竹内 富雄 (TAKEUCHI, Tomio) [JP/JP];  
〒108-0073 東京都 港区 三田 2-1 9-1 0-5 0 2  
Tokyo (JP).(74) 代理人: 大家 邦久 (OHIE, Kunihisa); 〒103-0013 東京  
都 中央区 日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビ  
ル 7 階 大家特許事務所 Tokyo (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

[続葉有]

(54) Title: ANGIOGENESIS INHIBITORS

(54) 発明の名称: 血管新生阻害物質



(I)

(57) Abstract: Compounds represented by the following general formula (I); a process for producing these compound by culturing a microorganism, which belongs to the genus *Aspergillus* and is capable of producing the compounds, and collecting the compounds from the culture medium; angiogenesis inhibitors comprising these compounds as the active ingredient; and an *Aspergillus* sp. F-1491 strain capable of producing these compounds: (I) wherein R represents methyl or ethyl; R<sup>1</sup> represents hydrogen, chlorine, hydroxy or methoxy; and R<sup>2</sup> represents hydroxy or R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> together form an epoxy ring structure.

[続葉有]

WO 03/076638 A1



TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,  
ZA, ZM, ZW.

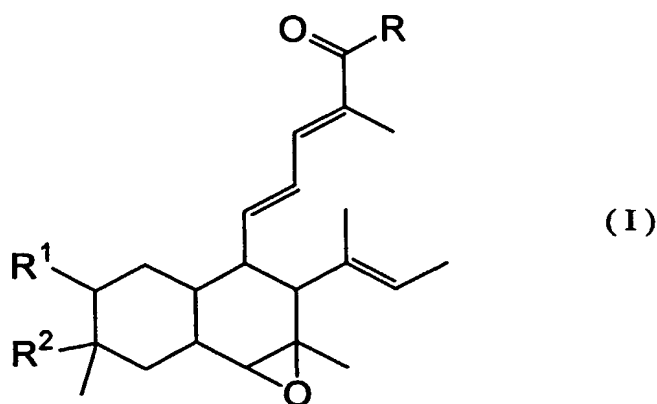
添付公開書類:  
— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

式 (I) で示される化合物、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属し前記化合物を生産する能力を有する微生物を培養して、培養物からその化合物を採取する化合物の製造方法、その化合物を有効成分とする血管新生阻害剤、及びその化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・エスピー (*Aspergillus* sp.) F-1491 株 (FERM BP-8288)。



(式中、R はメチル基またはエチル基を表わし、R<sup>1</sup> は水素原子、塩素原子、水酸基またはメトキシ基を表わし、R<sup>2</sup> は水酸基を表わすか、あるいは R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> とが一緒になってエポキシ環構造を形成する。)

## 明 細 書

## 血管新生阻害物質

## 5 技術分野

本発明は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する微生物が生産し血管新生阻害活性を有する新規化合物、その化合物を生産する能力を有する微生物を培養して、培養物からその化合物を採取する化合物の製造方法、その化合物を有効成分とする血管新生阻害剤、及びその化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・エスピー (*Aspergillus* sp.) F-1491 株 (FERM BP-8288) に関する。

## 背景技術

血管新生とは、一般的に、プロテアーゼによる血管の基底膜の消化・破壊、血管内皮細胞の遊走・増殖・細胞外マトリックスへの接着及び血管内皮細胞の分化による管腔形成、そして血管の再構成を伴う現象である。血管新生は生理的には黄体形成や胎盤形成に際して出現するものであるが、固形がん、糖尿病性網膜症、慢性炎症性疾患などの病態においても出現する。例えば、網膜症においては、先ず既存の網膜血管周囲の基底膜及び硝子体までのあいだに介在する網膜組織が破壊され、次いで既存の血管を構成する血管内皮細胞が網膜組織の破壊部位の間隙から遊走し、遊走した血管内皮細胞の隙間を埋めるように血管内皮細胞が増殖した後、網膜硝子体へ遊走した血管内皮細胞が血管を再構成することにより血管新生が進展する。また、固形がんが増殖するには、血管新生によって栄養や酸素の供給と老廃物の除去の道を確保する事が必須である。さらに、現在のがん治療上の大きな問題である転移において、その道を確保するという意味で血管新生が重要なステップとなって

いる。

血管新生は上述したとおり種々の疾患の発症あるいは進行過程に深く関わっていることから、これらの疾患の予防または治療に向けて、血管新生を阻害する物質を模索すべく研究が活発に推進されている。例えば、血管新生阻

5 害剤としては、血管内皮細胞の増殖阻害作用を有する微生物代謝産物フマギリン類縁体、コラゲナーゼ活性を阻害する作用を有するテトラサイクリン系抗生物質、ヘパリン結合性血管新生因子の受容体への結合抑制作用を有する微生物由来D-グルコガラクトン硫酸等の薬剤が知られており、いくつかの物質の臨床上での有効性が検討されている。

- 10 しかしながら、現在、血管新生阻害剤として臨床的に未だ満足できる薬剤がないため、血管新生に係わる上記疾患には十分な治療方法がない。特に糖尿病性網膜症においては、外科的治療法を施行しない限り新生血管の退縮は見られず、その新生血管からの出血による視力障害が問題となっていることから、血管新生に対して優れた効果を示す薬剤の開発が大いに切望されてい
- 15 る。

#### 発明の開示

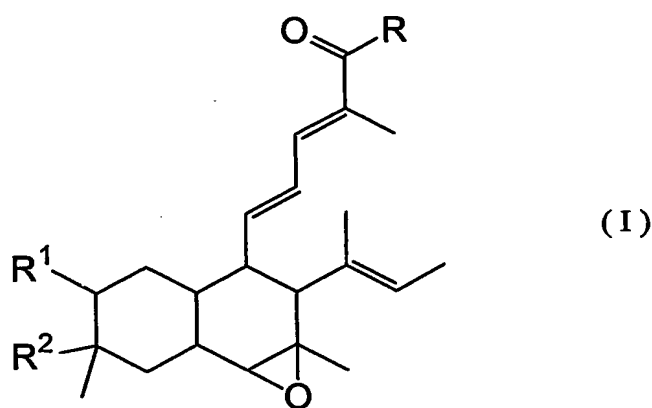
- 本発明の課題は、血管新生阻害活性を有する新規な化合物、それらの製造方法、それらの化合物を生産する能力を有する新規な微生物及びそれらの化
- 20 合物を有効成分とする血管新生阻害剤を提供することにある。

- 本発明者らは、上記課題を解決するため、各地の土壌から微生物を分離し、それらが生産する代謝産物について研究を重ねた結果、新たに分離したアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する微生物が、血管新生の阻害活性を示す物質を培養液中に生産していることを見出した。その培養液から有効物質を分
- 25 離精製し、その物理化学的性質を調べたところ、得られた有効物質は、いかなる既知物質とも相違し、かつ優れた血管新生阻害活性を有することを見出

し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、血管新生阻害活性を有する下記式 (I) で示される新規化合物、前記化合物を生産する能力を有するアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する微生物を培養して、その培養物から前記化合物を採取する化合物の製造方法、及びその化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・エスピー (*Aspergillus* sp.) F-1491 株 (FERM BP-8288) に関する。

1. 式 (I)



(式中、R はメチル基またはエチル基を表わし、R<sup>1</sup> は水素原子、塩素原子、水酸基またはメトキシ基を表わし、R<sup>2</sup> は水酸基を表わすか、あるいは R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> とが一緒になってエポキシ環構造を形成する。) で示される化合物。

2. 式 (I) 中、R がエチル基であり、R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> とが一緒になってエポキシ環構造を形成する前記 1 に記載の化合物。

3. 式 (I) 中、R がメチル基であり、R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> とが一緒になってエポキシ環構造を形成する前記 1 に記載の化合物。

4. 式 (I) 中、R がエチル基であり、R<sup>1</sup> が塩素原子、R<sup>2</sup> が水酸基である前記 1 に記載の化合物。

5. 式 (I) 中、R がメチル基であり、R<sup>1</sup> が塩素原子、R<sup>2</sup> が水酸基である前記 1 に記載の化合物。

6. 式 (I) 中、R がエチル基であり、R<sup>1</sup> が水素原子、R<sup>2</sup> が水酸基である前記 1 に記載の化合物。

7. 式 (I) 中、R がメチル基であり、R<sup>1</sup> が水素原子、R<sup>2</sup> が水酸基である前記 1 に記載の化合物。

5 8. 式 (I) 中、R がメチル基であり、R<sup>1</sup> がメトキシ基、R<sup>2</sup> が水酸基である前記 1 に記載の化合物。

9. 式 (I) 中、R がメチル基であり、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> が水酸基である前記 1 に記載の化合物。

10 10. アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属し、前記 1 に記載の化合物を生産する能力を有する微生物を培養して、その培養物から前記 1 に記載の化合物を採取することを特徴とする前記 1 に記載の化合物の製造方法。

11. 前記 1 に記載の化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・エスピー (*Aspergillus* sp.) F-1491 株 (FERM BP-8288)。

12. 前記 1 に記載の化合物を有効成分とする血管新生阻害剤。

15

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、F-1491A 物質の K B r 法での赤外部吸収スペクトルである。

図 2 は、F-1491B 物質の K B r 法での赤外部吸収スペクトルである。

#### 20 詳細な説明

本発明者らは、一般式 (I) で示される化合物の具体例を以下の通り命名した。

(1) R がエチル基で、R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> とが一緒になってエポキシ環構造を形成する化合物 : F-1491A、

25 (2) R がメチル基で、R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> とが一緒になってエポキシ環構造を形成する化合物 : F-1491B、

(3)Rがエチル基で、R<sup>1</sup>が塩素原子、R<sup>2</sup>が水酸基である化合物：F-1491C、

(4)Rがメチル基で、R<sup>1</sup>が塩素原子、R<sup>2</sup>が水酸基である化合物：F-1491D、

(5)Rがエチル基で、R<sup>1</sup>が水素原子、R<sup>2</sup>が水酸基である化合物：F-1491E、

(6)Rがメチル基で、R<sup>1</sup>が水素原子、R<sup>2</sup>が水酸基である化合物：F-1491F、

5 (7)Rがメチル基で、R<sup>1</sup>がメトキシ基、R<sup>2</sup>が水酸基である化合物：F-1491  
G、

(8)Rがメチル基で、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>が水酸基である化合物：F-1491H。

以後、本明細書においてこれらの化合物を上記名称を用いて説明するか、  
これら物質を一括してF-1491物質と呼ぶことがある。

10 なお、F-1491物質は、弱い抗真菌活性を有するとして報告されている *Fusarielin* 類と構造上の類似性を有している (*J.Antibiotics* 48(1),45~52(1995))。

しかしながら、本発明のF-1491物質は、その分子式、物理化学的性質、構造  
及び生物学的作用の特徴によって既知の *Fusarielin* 類とは明確に区別される  
新規物質である。

15 さらに本発明は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属し、血管新生阻害活  
性を示す式(I)で示される化合物を生産する能力を有する微生物を培養し、  
培養物から該化合物を採取する該化合物の製造方法、該化合物を生産する能  
力をもつアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する微生物並びに該化合物を有  
効成分とする血管新生阻害剤をも提供するものである。

20 本発明に使用される微生物は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属し、本  
発明のF-1491物質を生産する能力を有する菌株であれば、どのようなもので  
も使用できる。そのような微生物の探索は、例えば以下のようにして行なう  
ことができる。血管内皮細胞が増殖したマイクロプレート上に、種々の微生  
物培養液の抽出液を加え、増殖の指標である放射性同位体で標識されたチミ  
25 ジン等の細胞内への取り込みを測定する。この取り込み量の減少、すなわち  
血管内皮細胞の増殖が阻害された微生物の培養液から活性物質を単離、確認

することにより、目的の F-1491 物質を生産する能力をもつ微生物を得ることができる。

そのようにして見出された微生物として、例えば、本発明者らが土壌から分離したアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する F-1491 株を挙げることができるが、この菌株に限らず、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属し、本発明の F-1491 物質を生産する能力を有する菌株であれば、それらの変異株、例えば、紫外線、エックス線、放射線、薬品等の変異処理により取得できる人工変異株ならびに自然変異株も含めて、すべて本発明に使用することができる。

以下、F-1491 株の菌学的性状を説明する。

10 本菌株をツァペック・イーストエキス・アガー (Czapek Yeast Extract Agar : 以下 CYA と記す。)、モルトエキス・アガー (Malt Extract Agar : 以下 MEA と記す。)、20% シュクロース含有ツァペック・イーストエキス・アガー (Czapek Yeast Extract Agar with 20% Sucrose : 以下 CY20S と記す。) に接種し、25℃で7日間培養した結果、全ての寒天プレート上において平

15 坦からやや隆起した生育を示し、菌糸は密生した綿毛状からフェルト状で白色 (white) ~ 赤灰色 (reddish gray) (8A-B1-2) を呈する。裏面は表面とほぼ同様の色調を呈する。分生子形成による表面色調の変化は MEA 及び CY20S プレートにおいて灰緑色 (grayish green) (25C-D5-6) の呈色が認められる。生育速度は培地により異なり、25℃、1週間の培養条件下で

20 CYA プレートでは直径 56 ~ 58 mm、MEA プレートでは 24 ~ 26 mm、CY20S プレートでは 28 ~ 29 mm に達する。CYA プレートでは、37℃で 12 ~ 14 mm の生育を示す。長期間培養後の CYA プレートにおいては若干透明な滲出液 (exudate) の産生が認められる。全てのプレートにおいて可溶性色素の産生は認められなかった。なお、色調に関する記述は「メチューン・

25 ハンドブック・オブ・カラー (Methuen Handbook of Colour (Kornerup & Wanscher, 1978))」に従った。



形態的特徴として、光学顕微鏡による観察でアスペルジラム (aspergillum) 様の分生子形成構造が確認され、単列性 (uniseriate) の構造を成す。分生子形成細胞はフィアロ型、アンブル形で短い首を有する。柄 (stipe) は隔壁を持たず無色で平滑 (smooth) で、極端に短く  $40 \sim 80 \mu\text{m} \times 2.5 \sim 3.0 \mu\text{m}$  のものが数多く観察される。柄と栄養菌糸との結合部では柄足細胞 (foot cell) の存在も確認される。柄の先端より頂囊 (vesicle) を生じ、亜球形からフラスコ形で幅は  $10 \sim 15 \mu\text{m}$  のものが大半であった。メトレは全く観察されない。フィアライドは頂囊の先端から半分までのところより生じ、上方へ向かって生育し、アンブル形で平滑である。大きさは  $6.0 \sim 7.5 \mu\text{m} \times 1.8 \sim 2.5 \mu\text{m}$  である。分生子は1細胞性でほぼ全てのものが球形を示し、表面は平滑である。大きさは  $2.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$  で、分生子同士は形成時において鎖状に連なるが、明瞭な接続部は認められない。培養開始後4週間以上経過した検体からも閉子囊殻 (cleistothecium) 等の有性生殖器官の形成は確認されなかった。

以上の菌学的性質から、本発明者らは本菌株をアスペルギルス (Aspergillus) 属に属すると判断し、本菌株をアスペルギルス・エスピー (Aspergillus sp.) F-1491 と命名し平成13年10月2日付で日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに FERM P-18549 の受託番号で寄託し、平成15年1月31日付で、FERM BP-8288 番号の国際寄託に移管した。

本発明の F-1491 物質 は上記菌株を栄養源含有培地に接種し、好氣的に培養することにより製造される。F-1491 物質 の生産菌としては、アスペルギルス属に属し、F-1491 物質を生産する能力を有するものであれば、上記菌株に限らず全て本発明に利用できる。

上記微生物の培養方法は、原則的には一般微生物の培養方法に準ずるが、通常は液体培養による振盪培養、通気攪拌培養等の好氣的条件下で実施するのが好ましい。培養に用いられる培地としては、アスペルギルス属に属する

微生物が利用できる栄養源を含有する培地であればよく、各種の合成、半合成培地、天然培地などいずれも利用可能である。培地組成として、炭素源としてのグルコース、シュークロース、フルクトース、グリセリン、デキストリン、澱粉、糖蜜等を単独または組み合わせて用いることができる。窒素源としてはファーマメディア、ペプトン、肉エキス、大豆粉、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス、尿素等の有機窒素源を単独または組み合わせて用いることができる。その他、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩化コバルト等の塩類、重金属塩、ビタミンB及びビオチン等のビタミン類も必要に応じ、

5 添加使用することができる。

10

なお、培養中発泡が著しい場合には、各種消泡剤を適宜培地中に添加することもできる。消泡剤の添加にあたっては、目的物質の生産に悪影響を与えない濃度とする必要がある。培地のpHは5～9程度、通常中性付近とするのが望ましい。培養温度は、通常10～40℃、好ましくは20～27℃に

15 保つのがよい。培養日数は2～14日程度で、通常3～5日である。上述した各種の培養条件は、使用微生物の種類や特性、外部条件等に応じて適宜変更でき、最適条件を選択できるのはいうまでもない。培養液中に蓄積された本発明のF-1491物質はろ過、遠心分離等の既知の通常の固液分離手段によって菌体を分離し、その上清及び菌体から各々抽出することにより回収可能で

20 ある。

F-1491物質の分離、精製は、公知の種々の方法を選択、組み合わせて行うことができる。例えば、酢酸エチル、メタノール、n-ブタノール等を用いた溶媒抽出や、アンバーライトXAD（ローム・アンド・ハース社製）、ダイヤイオンHP-20（三菱化学社製）等のポリスチレン系吸着樹脂、シリカゲル、アルミナ、活性炭などの担体を用いるカラムクロマトグラフィー

25 による方法を用いることができる。これらの担体から目的物質を溶出させる

- 方法は、担体の種類、性質によって異なるが、一例として、ポリスチレン系吸着樹脂の場合には、溶出溶媒として、含水アルコール、含水アセトン等を用いることができる。さらにセファデックス (Sephadex) LH-20 (ファルマシア社製)、バイオ・ゲルP-2 (バイオ・ラッド社製) 等によるゲルろ過、
- 5 シリカゲル、アルミナ等による薄層クロマトグラフィー、順相あるいは逆相カラムを用いた分取用高速液体クロマトグラフィー (分取HPLC) 等を用いることができ、これらの方法を単独または適宜組み合わせて、場合によっては反復使用することにより、分離、精製することができる。

- 以上のようにして得られる F-1491A~F-1491H 物質は以下に示す物理化学的性質を有する。
- 10

1. F-1491A 物質の物理化学的性質

- (1) 形状：白色粉状、
- (2) 分子式： $C_{24}H_{34}O_3$ 、
- (高分解能FABマスマススペクトロメトリーによる $C_{24}H_{35}O_3$ の計算値  $m/z$  :
- 15  $371.2586(M+H)^+$  実測値  $m/z$  :  $371.2580$ )、
- (3) 比旋光度： $[\alpha]_D^{26} -194^\circ$  (c 0.1、メタノール)、
- (4) 融点： $55 \sim 58^\circ C$ 、
- (5) 赤外部吸収スペクトル：KBr法で測定した結果は、図1のとおりであり、特徴的な吸収は次のとおりである。
- 20 IR  $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$  : 2970、2915、1660、1630、1440、1375、1260、835、
- (6) 紫外部吸収スペクトル (メタノール中で測定) :
- UV  $\lambda_{max}$  nm : 280、
- (7) 溶解性：メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシドに可溶、
- 25 水に難溶、
- (8)  $^1H$ -NMRスペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメ

チルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度、スピン結合定数を表 1 に示す。

(9)  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度を表 2 に

5 示す。

## 2. F-1491B 物質の物理化学的性質

(1) 形状：白色粉状、

(2) 分子式： $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_3$ 、

(高分解能 FAB マススペクトロメトリーによる  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{O}_3$  の計算値  $m/z$   
10 : 357.2430( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> 実測値  $m/z$  : 357.2463) 、

(3) 比旋光度： $[\alpha]_{\text{D}}^{26} - 22.2^\circ$  (c 0.1、メタノール) 、

(4) 融点：53～56℃、

(5) 赤外部吸収スペクトル：KBr 法で測定した結果は、図 2 のとおりであり、また特徴的な吸収は次のとおりである。

15 IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)  $\cdot \text{cm}^{-1}$  : 2965, 2925, 1655, 1630, 1435, 1375, 1255, 835、

(6) 紫外部吸収スペクトル (メタノール中で測定) :

UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm : 280、

(7) 溶解性：メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシドに可溶、  
20 水に難溶、

(8)  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度、スピン結合定数を表 1 に示す。

(9)  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラ  
25 メチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度を表 2 に示す。

## 3. F-1491C 物質の物理化学的性質

(1) 形状：白色粉状、

(2) 分子式： $C_{24}H_{35}O_3Cl$ 、

(高分解能ESIマスマスペクトロメトリーによる $C_{24}H_{35}O_3Cl$ の計算値

5  $m/z$  : 429.2172( $M+Na$ )<sup>+</sup> 実測値  $m/z$  : 429.2204) 、

(3) 紫外外部吸収スペクトル (メタノール中で測定) :

UV  $\lambda_{max}$  nm : 280、

(4)  $^1H$ -NMRスペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度、スピン結

10 合定数を表1に示す。

(5)  $^{13}C$ -NMRスペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度を表2に示す。

## 4. F-1491D 物質の物理化学的性質

15 (1) 形状：白色粉状、

(2) 分子式： $C_{23}H_{33}O_3Cl$ 、

(高分解能ESIマスマスペクトロメトリーによる $C_{23}H_{33}O_3Cl$ の計算値

$m/z$  : 415.2016( $M+Na$ )<sup>+</sup> 実測値  $m/z$  : 415.2039) 、

(3) 紫外外部吸収スペクトル (メタノール中で測定) :

20 UV  $\lambda_{max}$  nm : 280、

(4)  $^1H$ -NMRスペクトル：重クロロホルムに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度、スピン結合定数を表1に示す。

(5)  $^{13}C$ -NMRスペクトル：重クロロホルムに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度を表2  
25 に示す。

## 5. F-1491E 物質の物理化学的性質

(1) 形状：白色粉状、

(2) 分子式： $C_{24}H_{36}O_3$ 、

(高分解能ESIマスマスペクトロメトリーによる $C_{24}H_{36}O_3$ の計算値  $m/z$  :

5  $z$  : 395.2562( $M+Na$ )<sup>+</sup> 実測値  $m/z$  : 395.2560) 、

(3) 紫外吸収スペクトル (メタノール中で測定) :

UV  $\lambda_{max}$  nm : 280、

(4)  $^1H$ -NMR スペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度、スピン結

10 合定数を表1に示す。

(5)  $^{13}C$ -NMR スペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度を表2に示す。

## 6. F-1491F 物質の物理化学的性質

15 (1) 形状：白色粉状、

(2) 分子式： $C_{23}H_{34}O_3$ 、

(高分解能ESIマスマスペクトロメトリーによる $C_{23}H_{34}O_3$ の計算値  $m/z$  :

$z$  : 381.2406( $M+Na$ )<sup>+</sup> 実測値  $m/z$  : 381.2408) 、

(3) 紫外吸収スペクトル (メタノール中で測定) :

20 UV  $\lambda_{max}$  nm : 280、

(4)  $^1H$ -NMR スペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度、スピン結合定数を表1に示す。

(5)  $^{13}C$ -NMR スペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度を表2に示す。

## 7. F-1491G 物質の物理化学的性質

(1) 形状：白色粉状、

(2) 分子式： $C_{24}H_{36}O_4$ 、

(高分解能ESIマスマスペクトロメトリーによる $C_{24}H_{36}O_4$ の計算値  $m/z$  :

5  $411.2511(M+Na)^+$  実測値  $m/z$  : 411.2533) 、

(3) 紫外外部吸収スペクトル (メタノール中で測定) :

UV  $\lambda_{max}$  nm : 280、

(4)  $^1H$ -NMRスペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度、スピン結

10 合定数を表1に示す。

(5)  $^{13}C$ -NMRスペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度を表2に示す。

## 8. F-1491H 物質の物理化学的性質

15 (1) 形状：白色粉状、

(2) 分子式： $C_{23}H_{34}O_4$ 、

(高分解能ESIマスマスペクトロメトリーによる $C_{23}H_{34}O_4$ の計算値  $m/z$  :

$397.2355(M+Na)^+$  実測値  $m/z$  : 397.2376) 、

(3) 紫外外部吸収スペクトル (メタノール中で測定) :

20 UV  $\lambda_{max}$  nm : 280、

(4)  $^1H$ -NMRスペクトル：重クロロホルムに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度、スピン結合定数を表1に示す。

(5)  $^{13}C$ -NMRスペクトル：重クロロホルムに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した。各シグナルの化学シフト、多重度を表2に示す。

表 1

炭素番号	F-1491 A <sup>b</sup>	F-1491 B <sup>b</sup>	F-1491 C <sup>b</sup>	F-1491 D <sup>a</sup>
1	1.07 t, (7.3)		1.06 t, (7.4)	
2	2.73 q, (7.3)	2.31 s	2.74 q, (7.4)	2.30 s
5	7.09 d, (11.0)	7.12 d, (11.0)	7.12 d, (11.0)	6.94 d, (11.0)
6	6.45 dd, (15.0, 11.0)	6.46 dd, (15.0, 11.0)	6.45 dd, (15.0, 11.0)	6.33 dd, (15.0, 11.0)
7	5.77 dd, (15.0, 10.0)	5.80 dd, (15.0, 10.3)	5.78 dd, (15.0, 10.5)	5.69 dd, (15.0, 10.5)
8	2.29 ddd, (11.0, 10.0, 5.0)	2.30 ddd, (10.7, 10.3, 5.1)	2.40 ddd, (11.0, 10.5, 5.0)	2.40 m
9	1.38 m	1.40 m	2.05 m	2.00 m
10	1.13 dd, (15.0, 12.0), 1.82 m	1.13 dd, (14.7, 12.2), 1.82 m	1.62 m, 1.68 m	1.60 m, 1.68 m
11	2.95 d, (6.0)	2.98 d, (5.6)	3.94 br	3.90 br
13	1.70 dd, (13.0, 12.5), 2.15 dd, (13.0, 3.0)	1.70 dd, (12.9, 12.2), 2.15 dd, (12.9, 2.5)	1.68 m, 1.80 m	1.55 m, 1.85 m
14	1.64 ddd, (13.0, 12.5, 3.0)	1.64 ddd, (13.4, 12.2, 2.5)	2.00 m	1.97 m
15	2.78 s	2.79 s	2.78 s	2.73 s
17	2.57 d, (5.0)	2.58 d, (5.1)	2.64 d, (5.0)	2.64 d, (5.0)
19	5.29 q, (7.0)	5.30 q, (7.0)	5.34 q, (7.0)	5.30 q, (6.5)
20	1.66 d, (7.0)	1.67 d, (7.0)	1.66 d, (7.0)	1.63 d, (6.5)
21	1.85 s	1.84 s	1.85 s	1.81 s
22	1.33 s	1.34 s	1.34 s	1.39 s
23	1.21 s	1.22 s	1.22 s	1.21 s
24	1.69 s	1.70 s	1.73 s	1.69 s
11-OMe				

a: CDCl<sub>3</sub>中で測定, b: CD<sub>3</sub>OD中で測定



表 1 (続き)

炭素番号	F-1491 E <sup>b</sup>	F-1491 F <sup>b</sup>	F-1491 G <sup>b</sup>	F-1491 H <sup>a</sup>
1	1.06 t, (7.2)			
2	2.74 q, (7.2)	2.31 s	2.33 s	2.32 s
5	7.12 d, (11.0)	7.14 d, (11.0)	7.16 d, (11.0)	6.98 d, (11.0)
6	6.46 dd, (15.0, 11.0)	6.46 dd, (15.0, 11.0)	6.47 dd, (15.0, 11.0)	6.38 dd, (15.0, 11.0)
7	5.82 dd, (15.0, 10.0)	5.85 dd, (15.0, 11.0)	5.84 dd, (15.0, 10.5)	5.73 dd, (15.0, 10.0)
8	2.37 m	2.37 m	2.35 m	2.40 ddd, (11.0, 10.0, 5.0)
9	1.34 m	1.35 m	1.70 m	1.82 m
10	1.06 m, 1.32 m	1.05 m, 1.34 m	1.16 m, 1.62 m	1.41 m, 1.47 m
11	1.30 m 1.65 m	1.30 m, 1.65 m	3.00 br	3.57 br
13	1.40 t, (13.0) 1.79 m	1.42 t (13.0) 1.80 m	1.55 m, 1.65 m	1.65 m, 1.75 m
14	1.91 m	1.92 m	1.90 m	1.96 m
15	2.77 s	2.77 s	2.75 s	2.75 s
17	2.62 d, (5.0)	2.61 d, (5.0)	2.63 d, (5.4)	2.67 d, (5.0)
19	5.31 q, (6.5)	5.30 q, (7.0)	5.32 q, (7.0)	5.31 q, (7.0)
20	1.66 d, (6.5)	1.65 d, (7.0)	1.66 d, (7.0)	1.66 d, (7.0)
21	1.84 s	1.84 s	1.84 s	1.85 s
22	1.22 s	1.23 s	1.23 s	1.32 s
23	1.22 s	1.23 s	1.21 s	1.25 s
24	1.71 s	1.71 s	1.70 s	1.71 s
11-OMe			3.27 s	

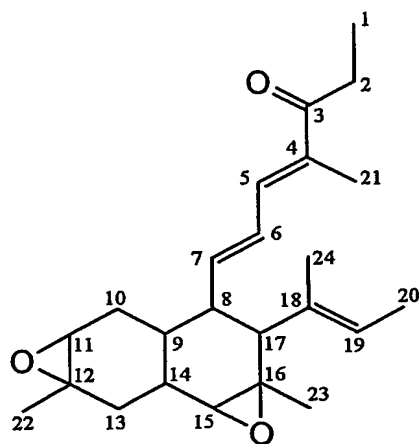
a: CDCl<sub>3</sub>中で測定, b: CD<sub>3</sub>OD中で測定

表 2

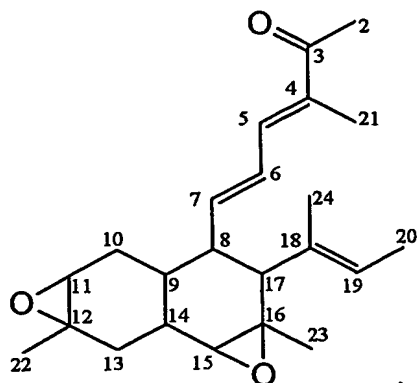
炭素 番号	F-1491 A <sup>b</sup>	F-1491 B <sup>b</sup>	F-1491 C <sup>b</sup>	F-1491 D <sup>a</sup>	F-1491 E <sup>b</sup>	F-1491 F <sup>b</sup>	F-1491 G <sup>b</sup>	F-1491 H <sup>a</sup>
1	9.2 q	-	9.3 q	-	9.3 q	-	-	-
2	30.8 t	25.6 q	31.3 t	25.6 q	31.3 t	25.6 q	25.6 q	25.6 q
3	205.2 s	202.4 s	205.1 s	200.0 s	205.1 s	202.5 s	202.5 s	199.9 s
4	135.3 s	136.0 s	135.2 s	135.1 s	134.9 s	135.6 s	135.7 s	135.0 s
5	139.9 d	141.1 d	139.9 d	139.0 d	140.1 d	141.6 s	141.5 d	139.1 d
6	128.6 d	128.6 d	128.7 d	127.5 d	128.3 d	128.3 d	128.6 d	127.3 d
7	146.5 d	146.7 d	146.6 d	144.9 d	147.6 d	148.0 d	147.6 d	145.6 d
8	45.4 d	45.4 d	44.7 d	43.7 d	46.1 d	46.1 d	45.7 d	44.2 d
9	34.3 d	34.1 d	31.5 d	30.2 d	38.5 d	38.5 d	31.3 d	30.1 d
10	31.6 t	31.6 t	36.0 t	34.9 t	28.0 t	28.0 t	29.8 t	34.4 t
11	61.3 d	61.4 d	66.7 d	65.3 d	40.0 t	40.0 t	84.4 d	74.0 d
12	60.2 s	60.1 s	73.2 s	72.9 s	70.7 s	70.7 s	72.7 s	72.2 s
13	36.8 t	36.9 t	39.1 t	38.2 t	44.8 t	44.8 t	40.5 t	39.2 t
14	35.2 d	35.3 d	37.9 d	36.7 d	38.5 d	38.5 d	38.1 d	37.0 d
15	64.5 d	64.5 d	65.5 d	63.9 d	66.0 d	66.0 d	65.9 d	64.1 d
16	62.5 s	62.5 s	62.6 s	61.3 s	62.7 s	62.7 s	62.6 s	61.5 s
17	54.8 d	54.6 d	55.1 d	53.5 d	55.0 d	55.0 d	55.2 d	53.1 d
18	134.2 s	134.1 s	134.2 s	132.5 s	134.6 s	134.5 s	134.4 s	132.8 s
19	126.9 d	127.0 d	127.3 d	126.2 d	128.0 d	126.9 d	127.1 d	125.6 d
20	13.6 q	13.6 q	13.6 q	13.6 q	13.6 q	13.6 q	13.6 q	13.7 q
21	11.7 q	11.5 q	11.7 q	11.4 q	11.7 q	11.4 q	11.4 q	11.5 q
22	23.1 q	23.0 q	29.0 q	29.2 q	31.6 q	31.6 q	27.7 q	27.7 q
23	22.1 q	22.1 q	22.4 q	22.0 q	22.4 q	22.4 q	22.4 q	22.0 q
24	19.5 q	19.5 q	18.9 q	19.0 q	19.0 q	19.0 q	19.5 q	19.5 q
11-OMe	-	-	-	-	-	-	57.2 q	-

a: CDCl<sub>3</sub> 中で測定, b: CD<sub>3</sub>OD 中で測定

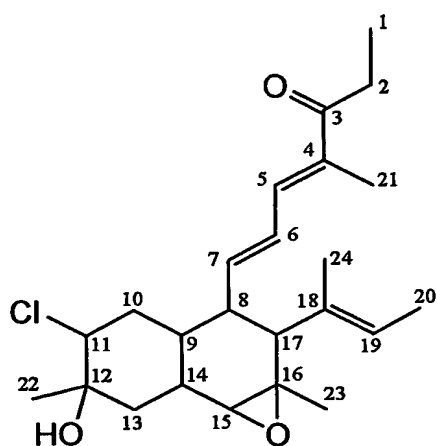
各種スペクトル解析の結果、F-1491A、F-1491B、F-1491C、F-1491D、F-1491E、F-1491F、F-1491G 及び F-1491H 物質の構造を下記に示すとおり決定した。



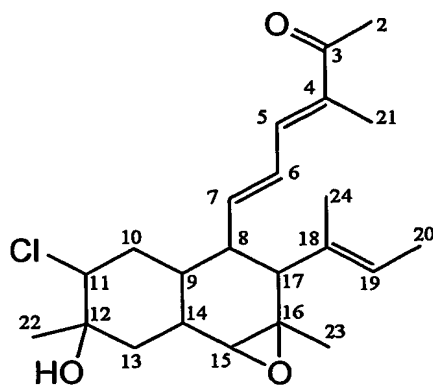
F-1491A



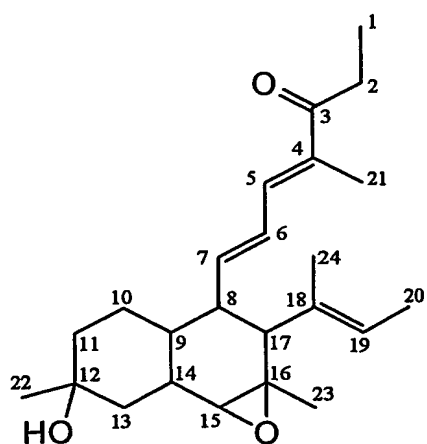
F-1491B



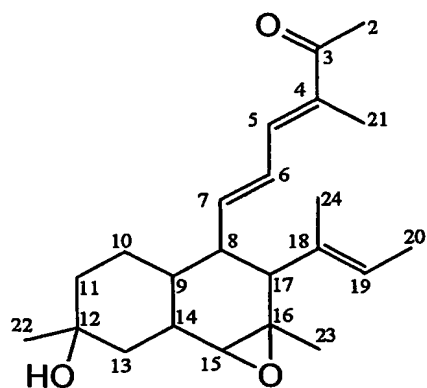
F-1491C



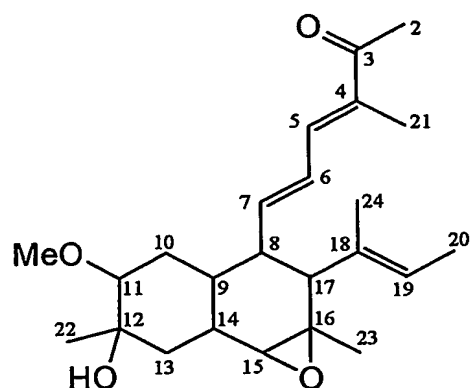
F-1491D



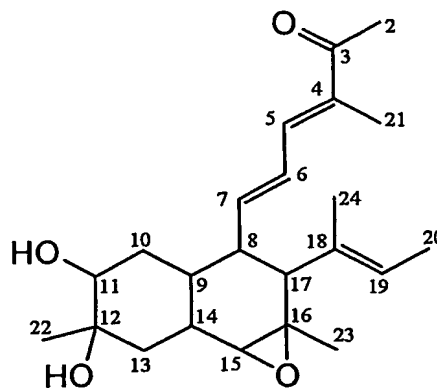
F-1491E



F-1491F



F-1491G



F-1491H

本発明の F-1491 物質 (F-1491A~F-1491H 物質) は、優れた血管新生阻害活性を有しており、しかも、細胞に対する毒性が低いので血管新生の亢進に伴伴する疾患、例えば固形がん細胞の増殖、糖尿病性網膜症、乾癬などの治療薬としての使用が期待される。

本発明の化合物の血管新生阻害活性は、例えば、ヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖抑制という指標で以下に述べる方法により測定することができる。コラーゲンコートした 96 穴マイクロプレート (住友ベークライト社) に  $10 \mu\text{g} / 1$  の塩基性繊維芽細胞増殖因子及び 10% 子牛血清を含む MCDB131 培地 (クロレラ工業社) で  $2 \times 10^3$  個/ウェルに調製したヒト臍帯静脈内皮細胞 (セルシステムズ社) 0.1ml を撒くと同時に試験試料を適当量添加する。37℃、5%  $\text{CO}_2$  を含む空気下で 48 時間培養し、さらに  $1 \mu\text{Ci} / \text{ウェル}$  の  $^3\text{H}$ -チミジンを加えて 8 時間培養する。次いで細胞をセルハーベスターを用いて集め、細胞に取り込まれた放射活性をシンチレーションカウンターを用いて測定する。

試験試料中に血管内皮細胞の増殖抑制に有効な物質が含まれる場合、細胞内に取り込まれる放射活性は抑制される。また試験試料の濃度に対する前記細胞の放射活性の変化により、この試験試料の有効な濃度域が求められる。

本発明の F-1491A~F-1491H 物質は下記表 3 に示すとおり、低濃度でヒト

臍帯静脈内皮細胞の増殖を抑制した。

表 3

化合物	50%阻害濃度 (mg/L)
F-1491A	2.2
F-1491B	3.4
F-1491C	7.4
F-1491D	4.6
F-1491E	3.2
F-1491F	9.3
F-1491G	7.7
F-1491H	5.6

また、本発明の F-1491A～F-1491H 物質は下記表 4 に示すとおり各種培養細胞に対してほとんど毒性を示さない。

表 4

細胞	50%増殖阻害濃度 (mg/L)							
	F-1491 A	F-1491 B	F-1491 C	F-1491 D	F-1491 E	F-1491 F	F-1491 G	F-1491 H
K562	39	36	52	80	68	72	95	61
H226	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
DLD-1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
HT1080	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

5

なお、試験は、以下のとおり行なった。各種ヒトがん細胞（K562（白血病）、H226（肺がん）、DLD-1（前立腺がん）、HT1080（線維肉腫））を10%子牛血清を含むRPMI1640培地またはDMEM培地を用いて、それぞれ $5 \times 10^3$ 個/ウェルとなるように調製し、96穴マイクロプレートに0.1ml 撒いた。同時に適当量の F-1491 物質（F-1491A～F-14

10

91H 物質) を添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>を含む空気下で72時間培養した。  
さらに0.5%のMTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]2,5-biphenyl tetrazolium bromide) を10μl加え4時間培養した。培養後、0.1mlの10%SDS-0.01N塩酸を加え、570nmの吸光度を測定し、50%増殖阻害濃度を求めた。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げ本発明を説明するが、本発明は下記の記載により限定されるものではない。

10

#### 実施例1：F-1491A 及びF-1491B 物質の単離

アスペルギルス・エスピー (Aspergillus sp.) F-1491 株 (FERM BP-8288) 株の斜面培地 (ポテトデキストロースアガー) から1白金耳を50mlの種母培地 (ポテト澱粉2%、グルコース1%、大豆粉 (エスサンミート：味の素社製) 2%、リン酸二水素カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.05%、pH無調整) を入れた500ml容の三角フラスコに接種し、25℃で2日間ロータリーシェーカー上で培養して種培養液を得た。生産培地としてグリセリン2%、ペプトン (極東製薬社製) 1%、酵母エキス0.5%、乾燥酵母 (エビオス：アサヒビール薬品社製) 0.5%からなる培地を用い、500ml容の三角フラスコにそれぞれ60mlを入れて殺菌後、種培地を1%ずつ接種した。25℃で4日間ロータリーシェーカー上で培養した後、得られた培養液10Lを遠心分離器にかけ、培養ろ液及び菌体に分離した。

得られた培養ろ液を、水で平衡化した2Lの吸着樹脂ダイヤイオン (Diaion) HP-20 (三菱化学社製) カラムに通過させた。活性成分が吸着された HP-20 カラムを50%メタノール水5Lで洗浄した後、メタノール3Lで活性成分を溶出した。溶出液より減圧下でメタノールを留去した。

一方、菌体はメタノール 3 L で抽出後、減圧下でメタノールを留去した。両者を合わせ、酢酸エチル 1 L で抽出した。この抽出液を減圧濃縮し、褐色油状物質 7.5 g を得た。これを少量のクロロホルムに溶解し、クロロホルムで充填したシリカゲルカラム (500 ml) に供した。クロロホルム 1 L 及び  
5 クロロホルム-メタノール混液 (50 : 1) 1 L で溶出した。F-1491A 物質及び F-1491B 物質を含む画分を集め、減圧濃縮し、黄色油状物質 1.2 g を得た。

これを少量のトルエンに溶解し、トルエンで充填したシリカゲルカラム (200 ml) に供した。このカラムをトルエン-アセトン混液 (20 : 1) で洗浄後、トルエン-アセトン混液 (10 : 1) で展開した。F-1491A 物質及  
10 び F-1491B 物質を含む画分を集め、減圧濃縮し、黄色粉状物質 200 mg を得た。

これを少量のメタノールに溶解し、分取用高速液体クロマトグラフ装置により分取した。分離カラムには Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス社製) 20 mm I.D. × 250 mm を使用し、アセトニトリル-水混液 (7 : 3) を移動層として 7 ml/min の流速で溶出し、F-1491A 物質及び F-1491B 物質  
15 を含む画分を集めた。それぞれの画分を減圧濃縮し、粗 F-1491A 物質 15 mg 及び粗 F-1491B 物質 13 mg を得た。さらに、それぞれの画分を少量のメタノールに溶解し、200 ml のセファデックス LH-20 カラム (ファルマシア社製) に供し、メタノールで溶出した。活性画分を集め、F-1491A 物  
20 質 10 mg 及び F-1491B 物質 7 mg を得た。

## 実施例 2 : F-1491C~F-1491H 物質の単離

実施例 1 と同様に培養した。培養ろ液 (130 L) を、水で平衡化した 15 L の吸着樹脂ダイヤイオン (Diaion) HP-20 (三菱化学社製) カラムに通過  
25 させた。活性成分が吸着された HP-20 カラムを 50% メタノール水 30 L で洗浄した後、メタノール 15 L で活性成分を溶出した。溶出液より減圧

下でメタノールを留去した。

一方、菌体はメタノール 15 L で抽出後、減圧下でメタノールを留去した。両者を合わせ、酢酸エチル 4 L で抽出した。この抽出液を減圧濃縮し、褐色油状物質 80 g を得た。これを少量のクロロホルムに溶解し、クロロホルム  
5 で充填したシリカゲルカラム (1000 ml) に供した。クロロホルム 2 L で洗浄後、クロロホルム-メタノール混液 (25 : 1) 2 L で溶出し、F-1491C、D、E、F、G 物質を含む画分を集めた。これを減圧濃縮し、黄色油状物質 12 g を得た。さらにクロロホルム-メタノール混液 (15 : 1) 2 L で溶出し、F-1491H 物質を含む画分を集め、減圧濃縮し、黄色油状物質 7 g を得た。

10 それぞれを少量のトルエンに溶解し、トルエンで充填したシリカゲルカラム (400 ml) に供した。F-1491C、D、E、F、G 物質を含む画分はトルエン-アセトン混液 (20 : 1) で洗浄後、トルエン-アセトン混液 (10 : 1) で展開した。F-1491C、D、E、F、G 物質を含む画分を集め、減圧濃縮し、黄色粉状物質 1.2 g を得た。F-1491H 物質を含む画分はトルエン-アセトン混液 (10 : 1) で洗浄後トルエン-アセトン混液 (3 : 1) で展開し、H 物質を含む画分を集め、減圧濃縮し、黄色粉状物質 0.8 g を得た。

これを少量のメタノールに溶解し、分取用高速液体クロマトグラフ装置により分取した。分離カラムには Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス社製) 20 mm I.D. × 250 mm を使用した。F-1491C、D、E、F、G 物質を含む画分  
20 はアセトニトリル-水混液 (7 : 3) を移動層として 7 ml/min の流速で溶出し、F-1491C、D、E、F、G 物質をそれぞれ含む画分を集めた。それぞれの画分を減圧濃縮し、F-1491C、D、E、F、G 物質をそれぞれ 10 mg を得た。さらに、F-1491H 物質を含む画分はアセトニトリル-水混液 (35 : 65) を移動層として 7 ml/min の流速で溶出し、F-1491H 物質を含む画分  
25 分を集めた。これを減圧濃縮し、F-1491H 物質を 15 mg を得た。

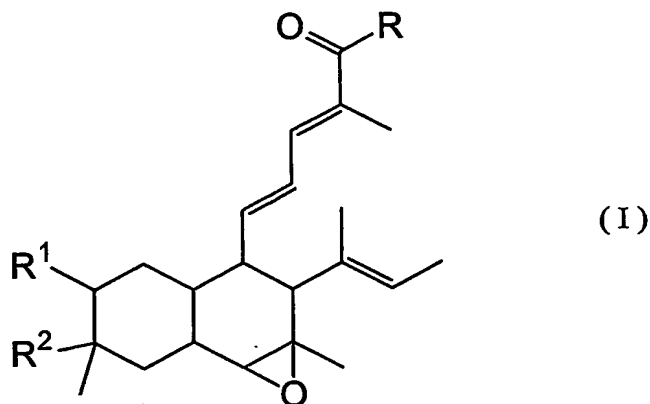


### 産業上の利用可能性

F1491 物質 (F-1491A～F-1491H 物質) は、優れた血管新生阻害活性を有し、また培養細胞に対する毒性が低いので、血管新生の亢進に随伴する疾患への治療薬としての利用が期待できる。

## 請 求 の 範 囲

## 1. 式 (I)



- 5 (式中、Rはメチル基またはエチル基を表わし、 $R^1$ は水素原子、塩素原子、水酸基またはメトキシ基を表わし、 $R^2$ は水酸基を表わすか、あるいは $R^1$ と $R^2$ とが一緒になってエポキシ環構造を形成する。)で示される化合物。

2. 式 (I) 中、Rがエチル基であり、 $R^1$ と $R^2$ とが一緒になってエポキシ環構造を形成する請求の範囲1に記載の化合物。
- 10

3. 式 (I) 中、Rがメチル基であり、 $R^1$ と $R^2$ とが一緒になってエポキシ環構造を形成する請求の範囲1に記載の化合物。

- 15 4. 式 (I) 中、Rがエチル基であり、 $R^1$ が塩素原子、 $R^2$ が水酸基である請求の範囲1に記載の化合物。

5. 式 (I) 中、Rがメチル基であり、 $R^1$ が塩素原子、 $R^2$ が水酸基である請求の範囲1に記載の化合物。

6. 式 (I) 中、R がエチル基であり、R<sup>1</sup> が水素原子、R<sup>2</sup> が水酸基である請求の範囲 1 に記載の化合物。

5 7. 式 (I) 中、R がメチル基であり、R<sup>1</sup> が水素原子、R<sup>2</sup> が水酸基である請求の範囲 1 に記載の化合物。

8. 式 (I) 中、R がメチル基であり、R<sup>1</sup> がメトキシ基、R<sup>2</sup> が水酸基である請求の範囲 1 に記載の化合物。

10

9. 式 (I) 中、R がメチル基であり、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> が水酸基である請求の範囲 1 に記載の化合物。

10. アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属し、請求の範囲 1 に記載の化合物を生産する能力を有する微生物を培養して、その培養物から請求の範囲 1 に記載の化合物を採取することを特徴とする請求の範囲 1 に記載の化合物の製造方法。

11. 請求の範囲 1 に記載の化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・エスピー (*Aspergillus* sp.) F-1491 株 (FERM BP-8288) 。

20

12. 請求の範囲 1 に記載の化合物を有効成分とする血管新生阻害剤。

図 1

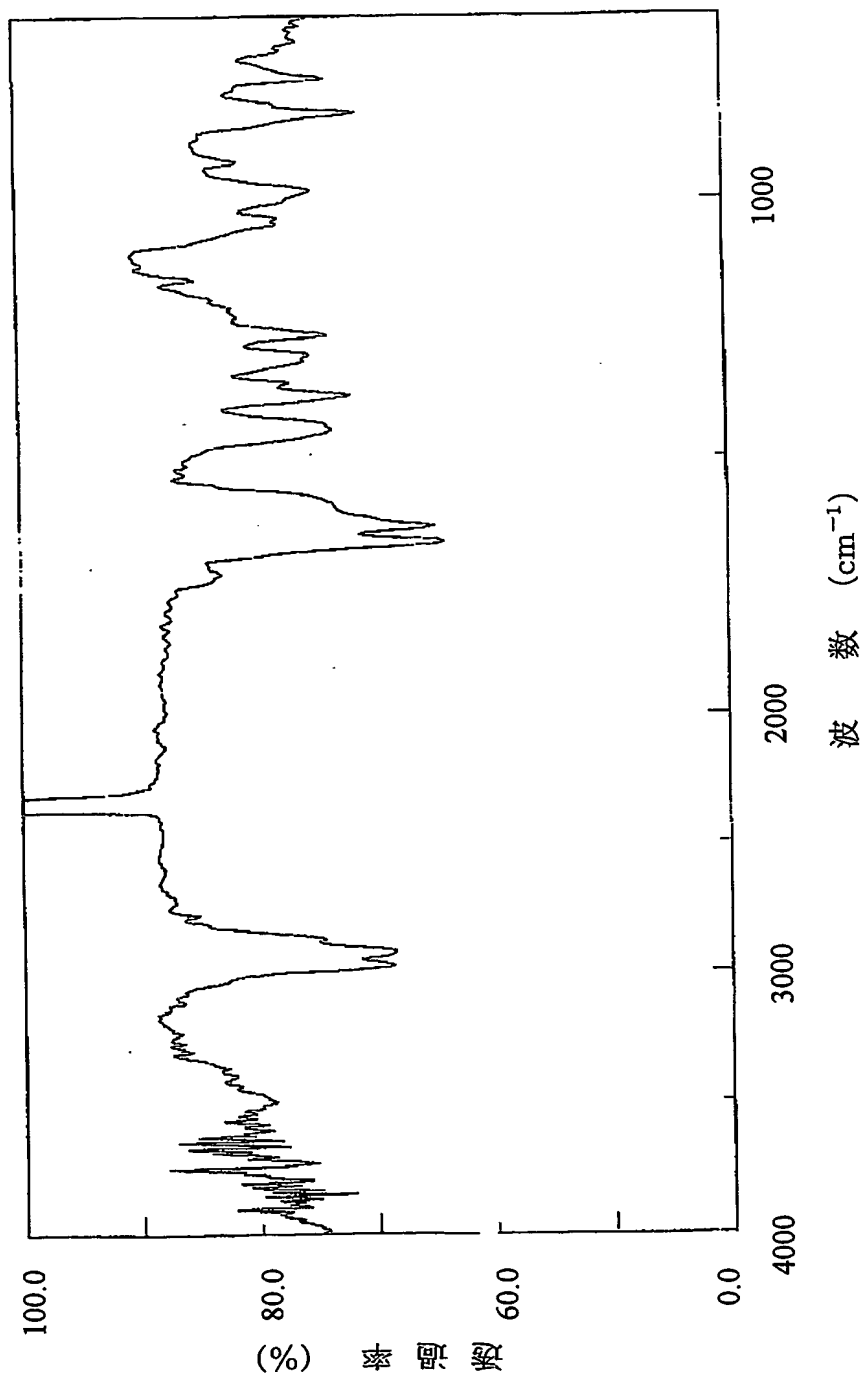
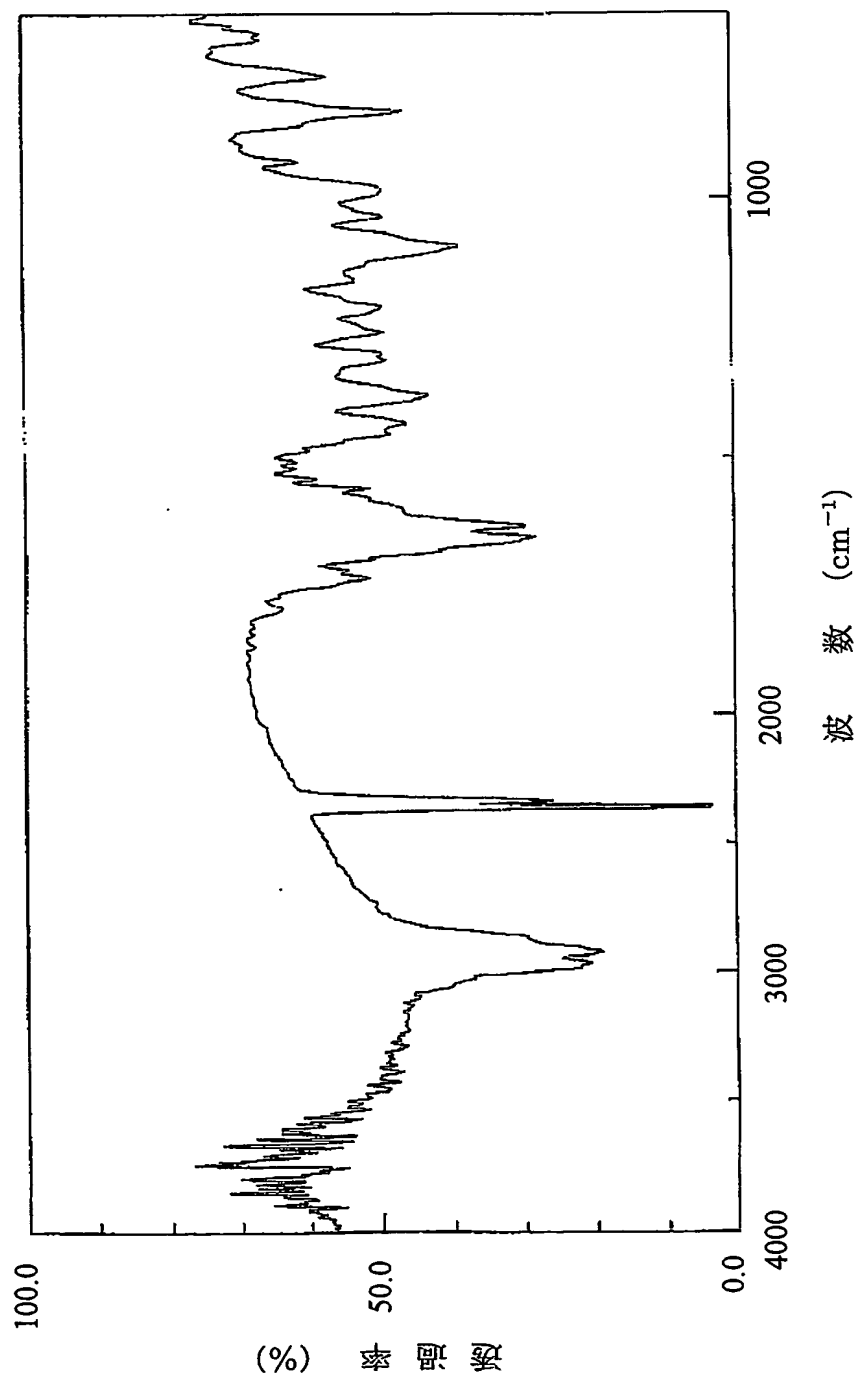


図 2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02634

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P17/02, C07D493/04, 303/32, A61P17/06, 27/02, 29/00,  
35/00, 43/00 // (C12P17/02, C12R1:66)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P17/02, C07D493/04, 303/32, A61P17/06, 27/02, 29/00,  
35/00, 43/00 // (C12P17/02, C12R1:66)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAS (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOBAYASHI H. et al., Isolation and structures of an antifungal antibiotic, fusarielin A, and related compounds produced by a Fusarium sp. J.Antibiot., 1995, 48(1), pages 42 to 52	1-12
A	US 5837726 A (Millennium Pharmaceuticals, Inc.), 17 November, 1998 (17.11.98), Full text (Family: none)	1-12
A	NAMIKOSHI M. et al., Isolation and characterization of bioactive metabolites from marine-derived filamentous fungi collected from tropical and sub-tropical coral reefs, Chem.Pharm.Bull., 2000, 48(10), p.1452-7	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 May, 2003 (13.05.03)

Date of mailing of the international search report  
27 May, 2003 (27.05.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02634

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MORISAKI N. et al., Coordination of Alkali Metal Cation to Oxygen Functions to Form Adduct Ion in Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry, Tetrahedron, 1996, 52(27), p.9017-24	1-12
A	WO 01/66783 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, et al.), 13 September, 2001 (13.09.01), Full text & US 2003/0073735 A1	1-12
A	JP 7-112995 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 02 May, 1995 (02.05.95), Full text (Family: none)	1-12

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P17/02, C07D493/04, 303/32, A61P17/06, 27/02, 29/00, 35/00, 43/00 //(C12P17/02 C12R1:66)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P17/02, C07D493/04, 303/32, A61P17/06, 27/02, 29/00, 35/00, 43/00 //(C12P17/02 C12R1:66)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CAS(STN), REGISTRY(STN), BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KOBAYASHI H. et al., Isolation and structures of an antifungal antibiotic, fusarielin A, and related compounds produced by a Fusarium sp. J. Antibiot., 1995, 48(1), p. 42-52	1-12
A	US 5837726 A(Millennium Pharmaceuticals, Inc.) 1998. 11. 17 全文(ファミリーなし)	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 05. 03

国際調査報告の発送日

27.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4B

3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3447



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	NAMIKOSHI M. et al., Isolation and characterization of bioactive metabolites from marine-derived filamentous fungi collected from tropical and sub-tropical coral reefs Chem. Pharm. Bull., 2000, 48(10), p. 1452-7	1-12
A	MORISAKI N. et al., Coordination of Alkali Metal Cation to Oxygen Functions to Form Adduct Ion in Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry Tetrahedron, 1996, 52(27), p. 9017-24	1-12
A	WO 01/66783 A1(KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, 外1名)2001. 09. 13 全文 & US 2003/0073735 A1	1-12
A	JP 7-112995 A(武田薬品工業株式会社)1995. 05. 02 全文 (ファミリーなし)	1-12